This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

OIPE JC88
NOV 13 2003
PATENT & TRADEMARK OFFICE

TSU-44

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: :
A. NAKAGAWA et al :
Serial No.: 10/680,024 :
Filed: October 7, 2003 :
For: CHLOROHYDRIN...GENE :

475 Park Avenue South
New York, N.Y. 10016
November 13, 2003

PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

With respect to the above-captioned application, Applicants claim the priority of the attached application as provided by 35 U.S.C. 119.

Respectfully submitted,
Muserlian, Lucas and Mercanti

Charles A. Muserlian, 19,683
Attorney for Applicants
Tel. # (212) 661-8000

CAM:ds
Enclosures

OIPE JC88
NOV 13 2003
PATENT & TRADEMARK OFFICE

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:	２００２年１０月　７日
出願番号 Application Number:	特願２００２－２９３５１２
[ST. 10/C] :	［ＪＰ２００２－２９３５１２］
出願人 Applicant(s):	ダイソー株式会社

２００３年１０月１４日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫

出証番号　出証特２００３－３０８４０１４

【書類名】　特許願

【整理番号】　KP-10544

【提出日】　平成14年10月 7日

【あて先】　特許庁長官殿

【発明者】

　【住所又は居所】　大阪府大阪市西区江戸堀１丁目１０番８号　ダイソー株式会社内

　【氏名】　中川　篤

【発明者】

　【住所又は居所】　大阪府大阪市西区江戸堀１丁目１０番８号　ダイソー株式会社内

　【氏名】　鈴木　利雄

【発明者】

　【住所又は居所】　奈良県生駒市高山町８９１６−５　奈良先端科学技術大学院大学内

　【氏名】　新名　惇彦

【発明者】

　【住所又は居所】　奈良県生駒市高山町８９１６−５　奈良先端科学技術大学院大学内

　【氏名】　加藤　晃

【発明者】

　【住所又は居所】　大阪府大阪市西区江戸堀１丁目１０番８号　ダイソー株式会社内

　【氏名】　井戸垣　秀聡

【特許出願人】

　【識別番号】　000108993

　【氏名又は名称】　ダイソー株式会社

【代理人】
【識別番号】　100078662
【弁理士】
【氏名又は名称】　津国　肇
【電話番号】　03(3502)7212
【選任した代理人】
【識別番号】　100075225
【弁理士】
【氏名又は名称】　篠田　文雄
【手数料の表示】
【予納台帳番号】　023836
【納付金額】　21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】　明細書　1
【物件名】　図面　1
【物件名】　要約書　1
【プルーフの要否】　要

【書類名】　明細書

【発明の名称】　クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項１】　下記の塩基配列：

（ａ）配列番号１に記載の塩基配列、

（ｂ）配列番号１に記載の塩基配列において、１から複数個の塩基が欠失、付加又は置換されている塩基配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、

（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であってクロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

（ｅ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から複数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換されているアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は

（ｆ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

のいずれかの塩基配列からなる遺伝子。

【請求項２】　下記のアミノ酸配列：

（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から複数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換されているアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列、又は

（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項３】　配列番号７のアミノ酸配列からなる、請求項２に記載のタンパク質を用いた休止菌体反応のための、シグナルペプチド。

【請求項４】　配列番号８の塩基配列からなる、請求項３に記載のシグナルペプチドをコードするＤＮＡ。

【請求項５】　請求項１に記載の遺伝子を含む、ベクター。

【請求項６】　さらに、請求項４に記載のＤＮＡを含む、請求項５に記載のベクター。

【請求項７】　プラスミドｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１である、請求項６に記載のベクター。

【請求項８】　請求項１に記載の遺伝子又は請求項５～７のいずれか１項に記載のベクターを含む、形質転換体。

【請求項９】　宿主が、大腸菌である、請求項８に記載の形質転換体。

【請求項１０】　宿主が、大腸菌ＪＭ１０９株又はＤＨ５α株である、請求項９に記載の形質転換体。

【請求項１１】　請求項１に記載の遺伝子を用いることを含む、請求項２に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項１２】　請求項２に記載のタンパク質を用いることを含む、光学活性体の製造方法。

【請求項１３】　請求項８～１０のいずれか１項に記載の形質転換体を用いることを含む、光学活性体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬、農薬、及び強誘電性液晶などに使用される光学活性化合物またはその中間体の合成において、有用なキラルビルディングブロックと成りうる光学活性クロロヒドリン、光学活性３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトン、光学活性ヒドロキシカルボン酸、およびその対掌体アルキルエステルの製造において有用な生体触媒であるヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素（Hydrox y Carboxylic ester Hydrolase：ＥｎＨＣＨと略す）、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換された形質転換体及びその形質転換体を用いた該酵素の製造方法に関する。更に該酵素及び該形質転換体を用いた光活性体の製造方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

光学活性化合物の製法としては、対応する光学活性出発物質から目的物へ変換する化学的合成法のほか、対応するラセミ体を光学分割剤で処理して光学活性体に分割する方法が一般的であるが、最近、微生物または酵素を用いて不斉還元や不斉加水分解反応を利用する生物学的方法により光学活性体を分離する方法が報告されている。

【０００３】

光学活性４－クロロ－３－ヒドロキシカルボン酸エステルの製法としては、サンタニエロ（E. Santaniello）らが、４－クロロ－３－オキソブタン酸エチルからパン酵母を用いた不斉還元法によるＳ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エチルの製法を報告している（非特許文献１）。また、高橋らも、４－クロロ－３－オキソブタン酸エチルの微生物を用いた不斉還元により光学活性４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エチルの製法を報告している（特許文献１）。

【０００４】

酵素を用いた製法では、ピーターズら（Peters et al.）はロドコッカス・エリスロポリス（Rhodococcus erythropolis）のカルボニルリダクターゼを用いた不斉還元法によりメチル３－オキソブタン酸あるいは４－クロロ－３－オキソブタン酸エチルからのＳ体３－ヒドロキシブタン酸メチルおよびＲ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エチルの製法を報告している（非特許文献２、３）。さらに、清水らはスポロボロマイセス・サルモニカラー（Sporoboromyces salmonicolor）AKU4429株のアルデヒドリダクターゼを用いたＲ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エチルの不斉還元法による製法を報告している（非特許文献４、５）。

【０００５】

しかし、これら微生物あるいは酵素を用いる不斉還元法によるプロキラルβ－ケトエステル体からの光学活性β－ヒドロキシエステル体の生産法においては、その反応に高価なＮＡＤＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）あるいはＮＡＤＰＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）等の補酵素を必要とし、さらにその酸化体から再度還元体へ変換する反応を必要とするためグルコースオキシダーゼあるいは蟻酸デヒドロゲナーゼ等の酵素を別途必要とするうえ、その反応工程が律速反応となるなどの観点から工業的製法とは言い難い。

【０００６】

光学活性３－ヒドロキシブタン酸エステルの製法としては、酵母（非特許文献６）やハロバクテリアハロビウム（Halobacterium halobium）（非特許文献７）などの微生物を用いたアセト酢酸エステルからの不斉還元法によるＳ体３－ヒドロキシブタン酸エステルの製法が知られている。しかし、この場合も反応に高価なＮＡＤＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）あるいはＮＡＤＰＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）等の補酵素を必要とする。

【０００７】

また、上記のハロバクテリア ハロビウム（Halobacterium halobium）をラセミ体３－ヒドロキシブタン酸エステルに作用させた場合、カルボン酸エステル加水分解反応によりＲ体３－ヒドロキシブタン酸エステルが残存することが報告されている。しかし、立体選択的なエステル分解活性を有する微生物を用いたラセミ体３－ヒドロキシブタン酸エステルからの高光学純度のＳ体３－ヒドロキシブタン酸エステルの製法は知られていない。

【０００８】

光学活性２－ヒドロキシブタン酸エステルの製法としては、リパーゼを用いた２級アルコールのエステル交換反応による２－ヒドロキシヘキサデカン酸エステルや２－ヒドロキシテトラコサン酸エステルからの製法が知られている（非特許文献８）。しかしながら、カルボン酸エステルの加水分解反応による光学活性２－ヒドロキシブタン酸エステルの製法は知られていない。

【０００９】

また、光学活性乳酸の微生物あるいは酵素を利用した製法としては、乳酸菌を

用いたグルコースからの発酵法（非特許文献９、１０）やシュードモナス（Pseudomonas）属の微生物を用いた２－ハロプロピオン酸からの脱ハロゲン化酵素による製法（非特許文献１１）が知られている。しかしながら、カルボン酸エステルを立体選択的に加水分解することによる光学活性乳酸エステルや乳酸の製法は知られていない。

【００１０】

また、光学活性テトラヒドロフラン－２－カルボン酸エステルの酵素を利用した製法としては、各種自然界由来のプロテアーゼ、リパーゼ（特許文献２、３）、エステラーゼ（特許文献４）を用いたラセミ体からの立体選択的加水分解による製法が知られている。しかしながら、Ｒ体テトラヒドロフラン－２－カルボン酸メチルを高光学純度で得る製法はない。また高価な酵素を購入しなければならない。

【００１１】

このような理由で、分離した菌株を培養し、高性能な酵素を安価にかつ大量に生産し、光学活性ヒドロキシカルボン酸およびその対掌体アルキルエステルの簡便な製造に応用することが強く望まれていた。

【００１２】

また、該酵素の遺伝子をクローニングできれば、遺伝子工学の手法を用いて該酵素を安価で大量に製造することが可能となるので、該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることが強く望まれていた。

【００１３】

このような点を解決するものとして、既に本発明者らは立体選択的エステル加水分解反応をもたらすエンテロバクター属に属する細菌であるEnterobacter sp. ＤＳ-Ｓ-７５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５４９４）を土壌より分離し、ラセミ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エステルのようなクロロヒドリンに微生物菌体あるいはその菌体産生物を作用させ、立体選択的脱クロル化およびエステル加水分解反応により、Ｓ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エステルを光学活性３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトンに変換し、残存するもう一方のＲ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エステルを同時に回収する方法を見出している（

特許文献５及び６、非特許文献１２）。

【００１４】

次いで、上記微生物菌体反応の基質特異性について研究をすすめた結果、該微生物が広くヒドロキシカルボン酸エステルを立体選択的に加水分解する性質を発見するに至った（特許文献７）。さらに、研究をすすめた結果、該菌体内から上記微生物菌体反応に関与する不斉加水分解酵素（ＥｎＨＣＨ）の精製に成功し、これをコードするＥｎＨＣＨ遺伝子を取得することに成功した。

【００１５】

【特許文献１】

特開昭６１－１４６１９１号公報

【特許文献２】

国際公開第０１／９２５５３号パンフレット

【特許文献３】

国際公開第０１／９２５５４号パンフレット

【特許文献４】

特開２００２－１７１９９４号公報

【特許文献５】

特開平９－４７２９６号公報

【特許文献６】

米国特許第５，７７６，７６６号明細書

【特許文献７】

特願平１３－３９１７２６号明細書

【非特許文献１】

サンタニエロら（E. Santaniello et al.）著、ジャーナル・オブ・ケミカル・リサーチ（J.Chem. Research）、１９８４年、ｐ１３２－１３３

【非特許文献２】

ピーターズら（J. Peters et al.）著、アプライド・マイクロバイオロジー・バイオテクノロジー（Appl. Microbiol. Biotechnol.）、１９９２年、第３８巻、ｐ．３３４－３４０

【非特許文献３】

ゼリンスキーら（T. Zelinski et al.）著、ジャーナル・オブ・バイオテクノロジー（J. Biotechnol.）、１９９４年、第３３巻、p．２８３－２９２

【非特許文献４】

清水ら著、バイオテクノロジー・レター（Biotechnol. Lett.）、１９９０年、第１２巻、p．５９３－５９６

【非特許文献５】

清水ら著、アプライド・マイクロバイオロジー・バイオテクノロジー（Appl. Microbiol. Biotechnol.）、１９９０年、第５６巻、p．２３７４－２３７７

【非特許文献６】

ハムダニら（Hamdani et al.）著、テトラヘドロン：アシンメトリー（Tetrahedron:Asymmetery）、１９９１年、第２巻、p．８６７－８７０

【非特許文献７】

エーラー及びゼーバッハ（Ehrler and Seebach）著、ヘルベチカ・キミカ・アクタ（Helv. Chim. Acta,）、１９８９年、第７２巻、p．７９３－７９９

【非特許文献８】

須貝ら著、有機合成化学会誌、１９９５年、第５３巻、p．４８－５８

【非特許文献９】

ブリン（Brin）著、バイオケミカル・プレパレーション（Biochem. Prepn.）、１９５３年、第３巻、p．６１

【非特許文献１０】

アンダーセン及びグリーブス（Andersen and Greaves）著、インダストリアル・エンジニアリング・ケミストリー（Ind. Eng. Chem.）、１９４２年、第３４巻、p．３４

【非特許文献１１】

左右田ら（Soda et al.）著、バイオデグラデーション（Biodegradation）、１９９５年、第6巻、p．２２３－２２７

【非特許文献１２】

鈴木ら著、エンザイム・アンド・マイクロバイアル・テクノロジー（Enzyme and Microb. Technol.）、１９９９年、第２４巻、p．１３－２０

【００１６】

【発明が解決しようとする課題】

立体識別性が向上し、微生物の触媒能力を従来と比較して飛躍的に増大することができ、さらに組換えＤＮＡの手法を用いて微生物を用いて大量生産することができるクロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素（ＥｎＨＣＨ）及びその遺伝子を提供する。また、該遺伝子を含むベクター、形質転換体、及び該酵素を用いる光学活性体の製造方法も提供する。また、形質転換体でも休止菌体反応が可能となるシグナルペプチドをコードする遺伝子も提供する。

【００１７】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、下記の塩基配列：

（ａ）配列番号１に記載の塩基配列、

（ｂ）配列番号１に記載の塩基配列において、１から複数個の塩基が欠失、付加又は置換されている塩基配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、

（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であってクロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

（ｅ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から複数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換されているアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は

（ｆ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

のいずれかの塩基配列からなる遺伝子が提供される。

また、本発明によれば、下記のアミノ酸配列：

（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から複数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換されているアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列、又は

（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質が提供される。

また、本発明によれば、本発明の形質転換体を用いた休止菌体反応のための、配列番号７のアミノ酸配列からなるシグナルペプチドが提供される。

また、本発明によれば、配列番号８の塩基配列からなるシグナルペプチドをコードするＤＮＡが提供される。

また、本発明によれば、本発明の遺伝子を含むベクターが提供される。好ましくは、ベクターは、シグナルペプチドをコードするＤＮＡを含み、さらに好ましくは、プラスミドｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１である。

また、本発明によれば、上記のベクターを含む形質転換体が提供される。好ましくは、宿主は、大腸菌であり、より好ましくは、大腸菌ＪＭ１０９株又はＤＨ５α株である。

また、本発明によれば、本発明の遺伝子又はタンパク質を用いることを含む、本発明のタンパク質の製造方法が提供される。

【００１８】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明によれば、下記の塩基配列：

（ａ）配列番号１に記載の塩基配列、

（ｂ）配列番号１に記載の塩基配列において、１から複数個の塩基が欠失、付加又は置換されている塩基配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、

（ｃ）配列番号１に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であってクロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、

（ｅ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から複数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換されているアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は

（ｆ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

のいずれかの塩基配列からなる遺伝子に関する。

【００１９】

本明細書において「１から複数個のアミノ酸が欠失、付加または置換されている」とは、例えば１～２０個、好ましくは１～１５個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個の任意の数のアミノ酸が欠失、付加または置換されていることを意味する。本明細書において「１から複数個の塩基が欠失、付加または置換されている」とは、例えば１～２０個、好ましくは１～１５個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個の任意の数の塩基が欠失、付加または置換されていることを意味する。

【００２０】

本明細書において「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる」とは、ＤＮＡ又はＲＮＡなどの核酸をプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる核酸を意味

し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のＤＮＡまたは該ＤＮＡの断片を固定化したフィルターを用いて、０．７～１．０ＭのＮａＣｌ存在下、６５℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍程度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０mM塩化ナトリウム、１５mMクエン酸ナトリウム）を用い、６５℃条件下でフィルターを洗浄することによって同定することができるＤＮＡをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Mannual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 以後 "モレキュラークローニング第２版" と略す）等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【００２１】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるＤＮＡとしては、プローブとして使用するＤＮＡの塩基配列と一定以上の相同性を有するＤＮＡが挙げられ、相同性は、例えば６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、特に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上である。

【００２２】

本明細書において、「クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素」とは、配列番号２のアミノ酸配列を有するタンパク質からなり、分子量は、７５．０kDaであり、分子量３７．５kDaのサブユニットのホモ二量体であり、等電点は、６．７である。

【００２３】

本明細書において「クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性」とは、

式〔１〕：

【００２４】

【化１】

$$\mathrm{Cl-CH_2-CHOH-CH_2-COOR^1} \qquad [1]$$

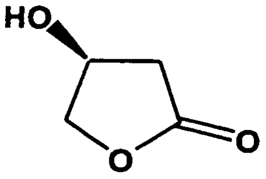
【００２５】

（式中、R^1はＣ１～Ｃ４のアルキル基である。）

に示すようなラセミ体クロロヒドリンを立体選択的に脱クロルおよび加水分解して、式〔２〕：

【００２６】

【化２】



[2]

に示すＳ体３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトンを生成し、Ｒ体クロロヒドリンを残存させる。また、下記式〔３〕：

【００２７】

【化３】

$$R^1-(CH_2)_n-CHOH-(CH_2)_m-COOR^2 \qquad [3]$$

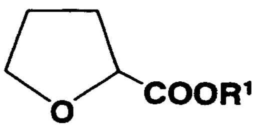
【００２８】

（式中、R^1は、メチル基またはベンジル基であり、R^2はＣ１～Ｃ４のアルキル基であり、そしてｍが０のときｎは０または１であり、ｍが１のときｎは０である。）

に示すような、ラセミ体ヒドロキシカルボン酸エステルを立体選択的に加水分解して、光学活性ヒドロキシカルボン酸を生成し、その対掌体エステルを残存させる。さらに下記式〔４〕：

【００２９】

【化４】



[4]

【００３０】

（式中、R^1は、Ｃ１～Ｃ４のアルキル基である。）

に示すような、ラセミ体テトラヒドロフラン－２－カルボン酸エステルを立体選択的に加水分解して、Ｒ体テトラヒドロフラン－２－カルボン酸エステルを残存させる
作用をいう。

【００３１】

また、本発明の遺伝子の取得方法は特に限定されない。本明細書中に開示した配列番号１に記載の塩基配列又は配列番号２に記載のアミノ酸配列の情報に基づいて適当なブローブやプライマーを調製し、それらを用いて当該遺伝子が存在することが予測されるＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることにより目的の遺伝子を単離することができる。

【００３２】

具体的には、本発明の配列番号１に示すＥｎＨＣＨ遺伝子は、例えばエンテロバクター属に属する微生物ＤＳ－Ｓ－７５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５４９４）の染色体ＤＮＡから分離することができる。その遺伝子供与体からのＥｎＨＣＨ遺伝子をもつＤＮＡ断片の取得は、例えば精製酵素ＥｎＨＣＨのポリペプチド鎖の部分アミノ酸配列をもとに行なうことができる。すなわち、精製酵素をエンドペプチダーゼにより消化し、プロテインシークエンサーにより各断片のアミノ酸配列の一部を決定し、これをもとにしてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）用プライマーを合成する。次いでエンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株の染色体ＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行ない、ＥｎＨＣＨ遺伝子の一部を増幅して、その塩基配列を明らかにする。得られたＥｎＨＣＨ遺伝子の部分塩基配列をプローブとして、遺伝子供与体の染色体ＤＮＡから常法により作製したＤＮＡライブラリーよりハイブリダイゼーション法を用いて目的の遺伝子のＤＮＡ断片を得ることができる。

【００３３】

取得したＥｎＨＣＨ遺伝子のＤＮＡ塩基配列の決定法としては、例えばジデオキシシークエンス法が挙げられる。この方法には、ＰＣＲにより遺伝子を増幅する方法や核酸分解酵素により欠失させる方法などの、遺伝子工学分野で慣用される様々な手法が含まれる。これらの方法により、配列番号１で示される目的のＤＮＡ塩基配列中に全アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲ

Ｆ）が確認できる。

【００３４】

本発明のＥｎＨＣＨをコードするＤＮＡは、ＥｎＨＣＨ活性を有するアミノ酸配列が実質的に配列番号２に示されているポリペプチドをコードする塩基配列を含むことを特徴とする。ここで、ＥｎＨＣＨ活性を有する限り、配列番号２に示したアミノ酸配列についてアミノ酸の１個又は数個の欠失、挿入、置換等があってもよい。例えば、ＤＮＡがコードするアミノ酸配列についてアミノ酸のいくつかの欠失、挿入、置換等を生じるようにＤＮＡを改変することは、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入法などの周知の方法で適宜行うことができる。また、配列番号１に示したＤＮＡまたは該ＤＮＡを適宜改変したＤＮＡを鋳型にして、Mn^{2+}イオンの存在下（通常０．５～１０mMの濃度）、または特定のヌクレオチドの濃度を低くしてＰＣＲ法を行うことによってランダムに変異が導入されたＤＮＡを得ることができる。このようにして得られたＤＮＡのうち、ＥｎＨＣＨの活性を有するタンパク質をコードするものが、本願発明に含まれることは言うまでもない。

【００３５】

また、本発明は、下記のアミノ酸配列：

（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から複数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換されているアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列、又は

（ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、クロロヒドリン及びヒドロキシカルボン酸エステル不斉加水分解酵素活性を有するアミノ酸配列

のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質にも関する。

【００３６】

本明細書において、「配列番号２に記載のアミノ酸配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列」とは、配列番号２のアミノ酸配列との相同性は６０％以上であれば特に制限はなく、例えば、６０％以上、好ましくは７０％

以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、特に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上であることを意味する。

【００３７】

本発明の酵素の精製方法は、特に限定されないが、通常のタンパク質の精製方法を適当に組み合わせることにより精製することができる。例えば、菌体を超音波により破砕後、硫酸アンモニウムによる塩析を行ない、沈殿の溶解物を疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせることにより、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下ＳＤＳ－ＰＡＧＥと略す）で単一になるまで精製することができる。

【００３８】

また、本発明はＥｎＨＣＨの上流に位置する配列番号７で示す２５アミノ酸からなるシグナルペプチドとそれをコードする遺伝子（配列番号８で示す）を提供する。このシグナルペプチドにより、該遺伝子を導入した大腸菌の形質転換体から高いＥｎＨＣＨ活性を菌体培養液の状態で得ることができる。また必要によっては該シグナル配列の遺伝子のみを他の有用な遺伝子に連結することができる。

【００３９】

さらに本発明はＥｎＨＣＨ活性を示すアミノ酸配列をコードする遺伝子の塩基配列を含む発現プラスミドを提供する。ＥｎＨＣＨの遺伝情報を担うＤＮＡ断片から必要な部分をベクターに組み込むことにより、宿主細胞に導入し形質転換体を得ることができる。このようなベクターとして好ましいのは、宿主細胞中で自律複製可能であり、さらに組換え宿主細胞のみを選別できるような適当な選択マーカーなどが付与されたものがあげられ、適当な宿主細胞内で、本発明の遺伝子を発現できるものである。さらに、このようなベクターは公知のベクター等から公知の技術を用いて業者が容易に製造し得るようなものであってもよいし、商業的に販売されているものでも良い。特に好ましいのはプラスミドｐＫＫ－２２３－３である。

【００４０】

さらに、本発明は、アミノ酸配列が実質的に配列番号２に示されているポリペ

プチドをコードするＤＮＡにより形質転換された、ＥｎＨＣＨ活性を有する酵素の産生能を有する微生物を提供する。

【００４１】

用いられる宿主細胞としては、得られた組換えベクターでもって形質転換され、かつ本遺伝子を発現させることができるようなものであれば特に制限なく使用することができる。このような宿主細胞としては、本発明の目的に沿って本遺伝子の発現を達成し得る限り、グラム陰性菌あるいはグラム陽性菌の区別なく、さらには、下等細胞あるいは高等細胞の区別なく、動物由来細胞であろうと植物由来細胞であろうと使用できる。

【００４２】

具体的に本発明で使用することのできる宿主細胞としては、例えば、大腸菌（Escherichia coli）、エンテロバクター属、サッカロミセス属、キサントモナス属、アセトバクター属、シュードモナス属、グルコノバクター属、アゾトバクター属、リゾビウム属、クレブシエラ属、サルモネラ属及びセラチア属から選ばれる微生物が挙げられるが、好ましくは大腸菌を用いる。特に好ましいのは、大腸菌ＤＨ５αである。ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）は、受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１９０１４として独立行政法人産業技術研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【００４３】

形質転換体は、適当な栄養培地中で培養を行なうことにより大量に得ることができる。培養に用いられる培地は微生物の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物質等を含む通常の培地であれば何でも良い。例えば炭素源としてグルコース，フラクトース等の炭水化物、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、プロピレングリコール等のアルコール類、酢酸，クエン酸，リンゴ酸，マレイン酸，フマル酸，グルコン酸とその塩類などの有機酸、またはそれらの混合物を用いることができる。窒素源として硫酸アンモニウム，硝酸アンモニウム，リン酸アンモニウム等の無機窒素化合物および尿素，ペプトン，カゼイン，酵母エキス，肉エキス，コーンスチープリカー等の有機窒素化合物とそれらの混合物を挙げることができる。その他、無機塩としてリン酸塩，マグネシウム塩，カリウム塩，マン

ガン塩，鉄塩，亜鉛塩，銅塩など、更に必要に応じてビタミン類を加えてもよい。また、高酵素活性を持った形質転換菌体を得るための酵素誘導添加物として、上記培地およびペプトン培地、ブイヨン培地等の栄養培地に使用する菌株に応じて、効果的に目的のＤＮＡを発現させるためにアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の抗生物質を培養液に添加してもよいし、イソプロピルβ－Ｄ（－）－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）等のプロモーターの活性化誘導剤を用いることもできる。培養は好気的条件下でpH４～１０、温度２０～６０℃の任意の範囲に制御して１～５日間培養を行えばよいが、用いる形質転換体により最適な条件で培養すると更に効果的である。

【００４４】

得られたＥｎＨＣＨ産生形質転換体の細胞から該酵素の抽出は次の方法で行うことができる。１）フレンチプレスや超音波破砕による機械的（物理的）方法、２）リゾチームなどの酵素処理方法、３）自己溶解法、４）浸透圧を利用した抽出法などの方法によって形質転換体を破壊して行うことができる。また大腸菌ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）は細胞を破砕しなくとも、培養液の状態で高活性な酵素として利用できる。

【００４５】

本方法で産生される酵素は、起源のエンテロバクター属におけるＥｎＨＣＨのポリペプチド配列と一致するもののみに限定されず、塩基配列変換や遺伝子変換などの遺伝子組換え手法を利用して得られるポリペプチドで、ＥｎＨＣＨ活性を示すものと解すべきである。すなわちペプチド配列中のアミノ酸の１個又は数個が欠損したもの、あるいはそのペプチド配列中のアミノ酸の１個又は数個が他のアミノ酸で置き換えられたものをも包含する。

【００４６】

こうして製造した立体選択的加水分解酵素を大量に産生する形質転換体は、安価な培地中で大量に調製することができ、バイオリアクターとしてＲ体４－クロロ－３－ヒドロキシカルボン酸エステル、Ｓ体３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトン、光学活性ヒドロキシカルボン酸、およびその対掌体エステルの製造およびの製造等に利用することができる。

【００４７】

特に大腸菌ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）は、遺伝子供与体（エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株）と比較して高い反応性を示し、中でもＳ体３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトン、Ｒ体３－ヒドロキシブタン酸、Ｓ体２－ヒドロキシブタン酸を短時間に高光学純度で得ることが可能である。

【００４８】

【実施例】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

【００４９】

〔実施例１〕ＥｎＨＣＨ酵素の精製

酵素活性の測定は０．５Mリン酸カリウム緩衝液（pH７．１５）に１％（v/v）４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチルを基質とし、３０℃で反応を行ない、遊離したクロルイオンを岩崎らの方法（Bull.chem.soc.Japan, 25, 226（1952））に従って比色定量した。１分間に１μmolのクロルイオンを遊離させる酵素量を１Ｕとした。タンパク質の定量は、２８０nmにおける吸収を測定して行なった。

【００５０】

エンテロバクター属ＤＳ-Ｓ-７５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５４９４）をＰＹＧ培地（１％ペプトン、１％酵母エキス、１％グリセロール、pH７．２）で培養し、遠心分離により菌体を調製した。

【００５１】

得られた湿菌体を超高圧細胞破砕装置により菌体を破砕後、遠心分離により菌体残さを除去し無細胞抽出液を得た。これに硫安を添加して５０％飽和において沈殿した画分を回収した。更に１．６Mの硫安を含む１０mM トリス－硫酸緩衝液（pH７．８）で平衡化したButyl－toyoperlによる疎水クロマトグラフィーを行なった。硫安濃度を０Mまで減少させ該酵素の活性画分を回収した。この画分に硫安を添加して８０％飽和における沈殿を１０mM トリス－硫酸緩衝液（pH７．８）に溶解し、同緩衝液にて透析を行なった。透析後、同緩衝液にて平衡化した

DEAE-sepharoseによるイオン交換カラムクロマトグラフィーを行なった。同緩衝液の濃度勾配（１０－２００mM）にて溶出を行ない、該酵素の活性画分を回収した。この画分に、限外ろ過膜（Mcrosep10K、ポールフィルトロン社製）により脱塩濃縮を行なった。濃縮液を０．１Mリン酸カリウム緩衝液で平衡化したSephadex-G150によるゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行ない、該酵素の活性画分を回収した。

【００５２】

得られた不斉加水分解酵素標品は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで解析した結果、単一バンドとなり、その分子量は３７．５kDaであった。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよび１０－２０％の濃度勾配を施した分離ゲルを用いたNative－ＰＡＧＥの結果、分子量は７５kDaであった。これらの結果から、該酵素は分子量３７．５kDaのサブユニットのホモ二量体であることがわかった。

【００５３】

精製の要約を表１に示したが、精製酵素の比活性は７６９０Ｕ／mg－タンパク質であり、粗酵素抽出液と比較して２２１倍であった。

【００５４】

【表１】

	容量 (ml)	総タンパク質量 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	精製度 (倍)
粗抽出液	90	2540	88300	34.8	100	1.0
0-50%硫安沈殿	200	1680	53800	32.0	61.0	0.90
Butyl toyopearl	173	142	38100	269	43.2	7.70
0-80%硫安沈殿	38.3	132	23000	174	26.0	5.0
DEAE-sepharose	75.3	5.95	28200	4750	32.0	136
Sephadex G-150	16.8	2.54	19500	7690	22.1	221

【００５５】

〔実施例２〕ＥｎＨＣＨ酵素の部分アミノ酸配列の解析

精製したＥｎＨＣＨ酵素４５μgをキモトリプシンで３７℃１時間処理した。１２．５％分離ゲルを用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥを行ない、ＰＶＤＦ膜に転写し、Ｎ末端および内部部分アミノ酸配列をアミノ酸シークエンサーによって決定した

。決定されたアミノ酸配列を配列番号３および４に示した。

【００５６】

〔実施例３〕ＥｎＨＣＨ遺伝子のクローニング

エンテロバクター属からの染色体ＤＮＡの調製

エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４９４）をＰＹＧ培地５ml中で２０時間培養し、遠心分離により菌体を回収した。菌体を４９０μlのＴＥ溶液（１０mMトリス－塩酸 pH８．０、１mM ＥＤＴＡ）に懸濁し、１０％ＳＤＳを３０μl、２０mg/mlプロテアーゼＫを５０μl添加し、５０℃で１時間反応させた。その後、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（２５：２４：１）による抽出を行なった後、０．１倍量の３M酢酸ナトリウム溶液を添加し、０．６倍量の２－プロパノールを静かに重層した。その結果、界面に生じたＤＮＡをガラス棒で糸状に巻きつけて回収した。

【００５７】

得られたＤＮＡを５００μlのＴＥ溶液に溶解させた。約１．１mgの染色体ＤＮＡを得た。

【００５８】

（２）プローブの作製

アミノ酸シークエンサーで決定した配列番号３および４のアミノ酸配列から予想されるＤＮＡ配列をコドン縮重を考慮してＰＣＲプライマーを合成し（配列番号５及び６に示す）、（１）で抽出した染色体ＤＮＡ５０ngを鋳型にしてＥｘＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（宝酒造株式会社製）を用いてＰＣＲ（熱変性９６℃、３０秒、アニーリング５０℃、１分、伸長反応７２℃、１分）を４０サイクル行ない、４℃まで冷却後アガロースゲル電気泳動により増幅ＤＮＡを確認し、ＤＮＡ断片を常法によりアガロースゲルより回収した。次いで、そのＤＮＡ断片をｐＵＣ１１８（宝酒造株式会社製）にサブクローニングし、塩基配列をＤＮＡシークエンサーで決定した。その結果、決定したＤＮＡ塩基配列中に、あらかじめ決定した部分アミノ酸配列（配列番号３および４）をコードする領域を確認できたので、得られた増幅ＤＮＡを常法に従って^{32}Ｐでラベルし、プローブＤＮＡとした。

【００５９】

（３）制限酵素地図の作成

抽出したＤＳ－Ｓ－７５株の染色体ＤＮＡを種々の制限酵素で切断し、１％アガロースゲルを用いて電気泳動後、ニトロセルロースメンブレンに転写させた。風乾後、（２）で作製したプローブを用いて、６５℃で２０時間ハイブリダイゼーション反応を行なった。

【００６０】

ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンは、①２×ＳＳＣ、６５℃、１５分、②１×ＳＳＣ、６５℃、３０分で洗浄し、Ｘ線フィルムと増感紙をあて、オートラジオグラムをとった。この結果、種々のシグナルを比較することにより、ＥｎＨＣＨ遺伝子領域近辺の制限酵素地図を作製した。

【００６１】

（４）ゲノムライブラリーからの遺伝子のクローニング

（３）で作製した制限酵素地図から目的とするＥｎＨＣＨ遺伝子の全長が含まれることを考慮して、プラスミドpBluescriptII KS（東洋紡績株式会社製）のＥｃｏＲＩ部位に約６０００塩基対のＤＳ－Ｓ－７５株の染色体ＤＮＡに由来する多種類のＤＮＡ断片を挿入したゲノムライブラリーを作製した。これを大腸菌ＤＨ５α株に導入して得られた形質転換体１６０個体をニトロセルロースメンブレンにレプリカした後、０．５N ＮａＯＨにメンブレンを浸して溶菌し、1M トリス塩酸（pH７．５）にメンブレンを浸して中和した。風乾後、（２）で作製したプローブを用いて、６５℃で２０時間ハイブリダイゼーション反応を行なった。

【００６２】

ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンは、①２×ＳＳＣ、６５℃、１５分、②１×ＳＳＣ、６５℃、３０分、③０．５×ＳＳＣ、６５℃、１時間で洗浄し、Ｘ線フィルムと増感紙をあて、オートラジオグラムをとった。この結果、陽性シグナルを与える１個の形質転換体を得た。

【００６３】

（４）塩基配列の決定

上記陽性株から常法によりプラスミドを抽出し、ｐＢｌ－ＥｎＨＣＨを得た。

これを、エキソヌクレアーゼIIIおよびマングマメのエンドヌクレアーゼ（mung bean endonuclease）により挿入遺伝子断片を種々欠失させ、それぞれの試料の塩基配列をジデオキシ法により決定し、得られた配列を重ね合わせ、ＢａｍＨＩ－ＰｓｔＩ間で塩基配列を決定した。決定した塩基配列とその塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号１に示す。またｐＢｌ－ＥｎＨＣＨの模式図を図１に示す。

【００６４】

また、配列番号３および４に示す精製ＥｎＨＣＨの部分アミノ酸配列は、陽性株由来の挿入ＤＮＡ断片の塩基配列から推定されるアミノ酸配列中に存在し、その部分アミノ酸配列が完全に一致した。

【００６５】

〔実施例４〕組換えプラスミドの作製

ＥｎＨＣＨ遺伝子の開始コドンと推定されるＡＴＧ配列は３個所に存在した。プラスミドｐＫＫ２２３－３のtacプロモーターの支配下に連結し、上記の各開始コドンおよび精製酵素のＮ末端から翻訳させる様に以下の手順で構築を行なった（図２、図３）。これら各々のＡＴＧ配列のすぐ上流にＥｃｏＲＩ認識配列を付与するため、配列番号９～１２に示すＰＣＲプライマーを設計し、Ｍ１３プライマーを組み合わせて、ｐＢｌ－ＥｎＨＣＨ１　５０ngを鋳型にしてＰＣＲ（熱変性９６℃、３０秒、アニーリング５０℃、３０秒、伸長反応７２℃、１分）を３０サイクル行なった（精製酵素のＮ末端については、メチオニンに置換した（図２））。４℃まで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅ＤＮＡを確認し、各種ＤＮＡ断片を常法によりアガロースゲルより回収した。次いで、そのＤＮＡ断片をＢＫＬキット（宝酒造株式会社製）を用いて平滑、リン酸化後、ｐＵＣ１１８のＨｉｎｃＩＩ制限酵素部位にサブクローニングし、各々について、上流約４００塩基の配列をＤＮＡシークエンサーで決定した。

【００６６】

得られた４種プラスミドを制限酵素Ｔｔｈ１１１ＩとＰｓｔＩで消化後、ｐＢｌ－ＥｎＨＣＨのＴｔｈ１１１Ｉ－ＰｓｔＩ断片を常法により挿入し、さらに、ＥｃｏＲＩ－ＰｓｔＩ消化断片をｐＫＫ２２３－３（ファルマシア製）ベクター

の同部位に挿入し、発現プラスミドｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１、ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ２、ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ３、ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ４を得た（図３）。

【００６７】

〔実施例５〕組換え大腸菌の作製

大腸菌ＪＭ１０９およびＤＨ５αのコンピテントセルを調製し、ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨで形質転換することにより、組換え大腸菌ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）、ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）を得た。なおＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ２）は得ることができなかった。また対照試料としてベクターのみで形質転換したＪＭ１０９（ｐＫＫ－２２３－３）、ＤＨ５α（ｐＫＫ２２３－３）も得た。

【００６８】

〔実施例６〕組換え大腸菌におけるＥｎＨＣＨ遺伝子の発現

（１）培養液の調製

実施例５で得た形質転換体を試験管に５ml入ったＬＢ培地（１％ポリペプトン、０．５％酵母エキス、１％塩化ナトリウム）で、２０時間、３７℃で好気的に培養した。なお、対照としてｐＫＫ２２３－３で形質転換したＪＭ１０９株、ＤＨ５α株も同様に培養した。また、エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株については、試験管に５ml入ったＰＹＧ培地（１％ポリペプトン、１％酵母エキス、１％グリセリン）を２０時間３０℃で好気的に種培養し、各種株から培養液試料を得た。

【００６９】

（２）組換え体の加水分解活性の評価

２５０mM トリス硫酸緩衝液に終濃度０．０５％（v/v）になるようにｐ－ニトロフェニルブチレートを添加し、反応液とした。この３mlに上記で調製した培養液試料２０μlを添加し、３０℃で反応させて加水分解反応により生成するｐ－ニトロフェノールに由来する４００nmの吸光度の増大を測定した。結果を表２に示す。なお１Ｕは、３０℃で１分間あたりに１μmolのｐ－ニトロフェノールの生成量を表わし、調製した培養液あたりの比活性を算出した。

【００７０】

【表２】

菌株名	比活性(U/ml)
エンテロバクター属 DS-S-75 株	3.16
JM109(pKK-EnHCH1)	12.6
JM109(pKK-EnHCH2)	13.8
JM109(pKK-EnHCH3)	2.76
JM109(pKK-EnHCH4)	2.37
JM109(pKK223-3)	0
DH5α(pKK-EnHCH1)	34.0
DH5α(pKK223-3)	0

【００７１】

その結果、ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨで形質転換された大腸菌は、加水分解活性を所持し、その活性はエンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株と比較して大幅に向上した。なかでもＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）の培養液あたりの加水分解活性は約１０．８倍であった。

【００７２】

ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ２）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ３）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ４）の４株ではＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ２）が最も高活性であった。また、図２に示した塩基配列上２番目のＡＴＧ配列のすぐ上流には、リボソームが結合するＳＤ（シャイン・ダルガーノ）配列がみられることから、ＥｎＨＣＨ遺伝子の本来の開始コドンは２番目のＡＴＧであることが示唆された（配列番号１）。すなわち、図２で示したアミノ酸配列の２番目のメチオニン残基が、本来ＤＳ－Ｓ－７５株で翻訳されうるＥｎＨＣＨのＮ末端である。

【００７３】

（３）組換えタンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ

（１）で調製したＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ２）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ３）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ４）の培養液試料を遠心分離により除菌し、２０mMリン酸カリウム緩衝液で懸濁後、超音波破砕した。各５μgの抽出タンパク質試料およびエンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株から精製したＥｎＨＣＨをＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１

０％分離ゲル）に共し、クマシーブリリアントグリーンによる染色を行なった。その結果、いずれの組換え大腸菌でもエンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株から精製したＥｎＨＣＨと同じ位置にバンドが確認された（図４）。用いた分子量マーカーと分子量を下記に記す。ホスホリラーゼＢ（９７，４００）、ウシ血清アルブミン（６６，２００）、オボアルブミン（４５，０００）、カルボニックアンヒドラーゼ（３１，０００）、トリプシンインヒビター（２１，５００）。

【００７４】

実施例２で示すように、精製酵素のＮ末端アミノ酸はバリンであった。また、配列番号２で示すＥｎＨＣＨの推定アミノ酸配列のＮ末端側には、多くの疎水性残基、正に荷電した残基、および切断される認識配列としてAla－Xaa－Ala配列が存在することから翻訳開始メチオニンから２５残基のアミノ酸配列はシグナルペプチドであることが示唆された（配列番号７）。また、ＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果から、大腸菌においてもシグナルペプチドの切断が行われていることが明らかとなった。また、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ２）の活性がＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ３）、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ４）と比較して高いことから、シグナルペプチドは、大腸菌での安定な発現と膜移行に重要であることがいえる。

【００７５】

〔実施例７〕組換え大腸菌によるカルボン酸エステルの光学分割

（１）４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチルの光学分割

３００ml容の三角フラスコにアンピシリンを含むＬＢ培地６０mlを調製し、ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）を３７℃で１６時間振とう培養した。また、対照としてベクターのみで形質転換させたＤＨ５α（ｐＫＫ２２３－３）を調製した。また、エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株については、ＰＹＧ培地６０mlで培養した。各々の培養液に再終濃度が５％（w/v）になるように炭酸カルシウムと８％（w/v）になるようにラセミ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチルエステルを基質として加え、３０℃で１時間振とう反応させた。また、エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株については、同様に再終濃度２％の基質で２４時間振とう反応もあわせて行なった。反応終了後、遠心分離にて除菌し、反応液中

に残存する４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチルエステルの濃度をガスクロマトグラフィー（カラム担体：ＰＥＧ２０Ｍ、６０－８０メッシュ）で分析した。さらに、上記除菌液から等量の酢酸エチルで抽出し、アステック社製のＧ－ＴＡ（０．２５㎜×３０ｍ）を用いたガスクロマトグラフィーにより、残存していた４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチルの光学純度を測定した。その結果、リテンションタイムはＲ体１４．７分、Ｓ体１５．７分であった。分析条件：カラム温度１１０℃、検出器温度２００℃、キャリアーガス 窒素；流速、０．８ml/分、検出器ＦＩＤ；スプリット比１００／１。

【００７６】

さらに酢酸エチル抽出を２回行ない、水層画分をエバポレーターで濃縮した。無水硫酸マグネシウムにより脱水し、３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトンのシロップを得た。シロップ１０μlに１，２－ジクロロエタン５００μl、トリフルオロ酢酸無水物１００μlを加え３０分放置することによりトリフルオロ化を行ない、減圧下で溶媒を除去後、エタノールに溶解させ、Ｇ－ＴＡ（０．２５㎜×３０ｍ）を用いたガスクロマトグラフィーにより３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトンの光学純度を測定した。リテンションタイムはＲ体１８．７分、Ｓ体１９．９分であった。分析条件：カラム温度１２０℃、検出器温度２００℃、キャリアーガス 窒素；流速、０．８ml/分、検出器ＦＩＤ；スプリット比１００／１。

【００７７】

その結果、ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）は、遺伝子供与体（エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株）と比較して反応速度が向上した。また、高い立体識別性を所持し、Ｒ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチル、生成したＳ体３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトンとも高光学純度であり、Ｓ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸エチルのほぼ全量がＳ体３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトンに変換された。また、ＤＨ５α（ｐＫＫ２２３－３）に分割能力はなかった。反応後、残存したＲ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチルの光学純度、および反応開始前のラセミ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチルの量を１００％としたときの収率、生成したＳ体３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトンの光学純度の測定結果を表３に示す。

【００７８】

【表３】

	4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸メチル		3-ヒドロキシ-γ-ブチロラクトン
	光学純度(%ee)	収率(%)	光学純度(%ee)
DH5α(pKK-EnHCH1) (1hr)（基質 8%)	99.1(R)	49.2	99.9(S)
DH5α(pKK-223-3) (1hr)（基質 8%)	0	100	生成なし
DS-S-75 (1hr)（基質 8%)	11.8(R)	88.4	N.D.
DS-S-75 (24hr)(基質 2%)	99.5(R)	48.0	95.9(S)

【００７９】

（２）３－ヒドロキシブタン酸エチルの光学分割

実施例７の（１）と同様に菌体各種を培養し、各々の培養液に再終濃度が５％(w/v)になるように炭酸カルシウムと８％(w/v)になるようにラセミ体３－ヒドロキシブタン酸エチルを基質として加え、３０℃で１時間振とう反応させた。また、エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株については、同様に４時間振とう反応もあわせて行なった。反応終了後、菌体を遠心分離により除去した。

【００８０】

反応液中に残存する３－ヒドロキシブタン酸エチルの濃度をガスクロマトグラフィー（カラム担体：ＰＥＧ２０Ｍ、６０－８０メッシュ）で分析した。さらに実施例７の（１）と同様に、上記除菌液を等量の酢酸エチルで２回抽出し、酢酸エチル層を減圧下で溶媒を除去し３－ヒドロキシブタン酸エチルのシロップを得た。トリフルオロ酢酸無水物でトリフルオロ化した後、アステック社製のＧ－ＴＡ（０．２５mm×３０m）を用いたガスクロマトグラフィーにより、光学純度を測定した。リテンションタイムはＲ体８．１分Ｓ体１２．１分であった。分析条件：カラム温度９０℃、検出器温度２００℃、キャリアーガス 窒素；流速、０．7ml/分、検出器ＦＩＤ；スプリット比１００／１。

【００８１】

一方、水層に分画された３－ヒドロキシブタン酸の濃度も、ガスクロマトグラフィー（カラム担体：ＰＥＧ２０Ｍ、６０－８０メッシュ）で分析した。その際、水溶液のpHをリン酸によりpH４にして行なった。水層をエバポレーターで濃縮し、３－ヒドロキシブタン酸のシロップを得た。３０ml溶の三角フラスコにシロップを５０mg入れ、氷冷しながら４－ジメチルアミノピリジンを１２２mg、ジクロロメタンを１０ml、エタノールを１００μl、塩酸１－エチル３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドを１１５mg加え１０分ほど撹拌した後、蓋をして室温で一晩撹拌した。有機層を１N塩酸で２回洗浄した後デシケーターにて溶媒を除去し、３－ヒドロキシブタン酸エチルへと変換した。これを同様にトリフルオロ化した後、ガスクロマトグラフィーにて光学純度の測定を行なった。

【００８２】

その結果、ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）は、遺伝子供与体（エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株）と比較して反応速度が向上した。両株とも高い立体識別性を所持していた。また、ＤＨ５α（ｐＫＫ２２３－３）に分割能力はなかった。反応後、残存したＳ体３－ヒドロキシブタン酸エチルの光学純度、および反応開始前のラセミ体３－ヒドロキシブタン酸エチルの量を１００％としたときの収率、生成したＲ体３－ヒドロキシブタン酸の光学純度の測定結果を表４に示す。

【００８３】

【表４】

	3-ヒドロキシブタン酸エチル		3-ヒドロキシブタン酸
	光学純度(%ee)	収率(%)	光学純度(%ee)
DH5α(pKK-EnHCH1) (1hr) (基質 8%)	99.2(S)	49.2	99.9(R)
DH5α(pKK-223-3) (1hr) (基質 8%)	0	100	生成なし
DS-S-75 (1hr) (基質 8%)	37.1(S)	72.0	N.D.
DS-S-75 (4hr) (基質 8%)	99.1(S)	49.0	98.2(R)

【００８４】

（３）組換え大腸菌による２－ヒドロキシブタン酸エチルの光学分割

ラセミ体３－ヒドロキシブタン酸エチルをラセミ体２－ヒドロキシブタン酸エチルに変えた以外は実施例７の（２）と同様の方法で反応した。ただし、反応時間は組換え大腸菌は２４時間、ＤＳ－Ｓ－７５株は２４および３６時間とした。反応終了後、濃度、光学純度の解析を行なった。リテンションタイムはＲ体７．４分、Ｓ体７．８分であった。光学純度分析条件：カラム温度９０℃、検出器温度２００℃、キャリアーガス 窒素；流速、０．７ml/分、検出器ＦＩＤ；スプリット比１００／１。

【００８５】

その結果、ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）は、遺伝子供与体（エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株）と比較して反応速度が向上し、また高い立体識別性を所持していた。反応後、残存したＲ体２－ヒドロキシブタン酸エチルの光学純度、および反応開始前のラセミ体２－ヒドロキシブタン酸エチルの量を１００％としたときの収率、生成したＳ体２－ヒドロキシブタン酸の光学純度の測定結果を表５に示す。

【００８６】

【表５】

	2-ヒドロキシブタン酸エチル		2-ヒドロキシブタン酸
	光学純度(%ee)	収率(%)	光学純度(%ee)
DH5α(pKK-EnHCH1) (24hr) (基質 8%)	98.3(R)	49.0	98.9(S)
DH5α(pKK-223-3) (24hr) (基質 8%)	0	100	生成なし
DS-S-75 (24hr) (基質 8%)	77.3(R)	60.1	N.D.
DS-S-75 (36hr) (基質 8%)	99.2(R)	49.3	95.1(S)

【００８７】

（４）組換え大腸菌によるテトラヒドロフラン－２－カルボン酸メチルの光学分割

実施例７の（１）と同様に菌体各種を培養し、各々の培養液に再終濃度が５％

（w/v）になるように炭酸カルシウムと１％（w/v）になるようにラセミ体テトラヒドロフラン－２－カルボン酸メチルを基質として加え、３０℃で２時間振とう反応させた。また、エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株については、同様に４時間および２４時間振とう反応させた。反応終了後、菌体を遠心分離により除去した。

【００８８】

反応液中に残存するテトラヒドロフラン－２－カルボン酸メチルの濃度をガスクロマトグラフィー（カラム担体：ＰＥＧ２０Ｍ、６０－８０メッシュ）で分析した。さらにアステック社製のＧ－ＴＡ（０．２５㎜×３０ｍ）を用いたガスクロマトグラフィーにより、光学純度を測定した。リテンションタイムはＲ体８．４分、Ｓ体９．５分であった。分析条件：カラム温度１１０℃、検出器温度２４０℃、キャリアーガス 窒素；流速、０．７ml/分、検出器ＦＩＤ；スプリット比１００／１。

【００８９】

その結果、ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）は、遺伝子供与体（エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株）と比較して反応速度が向上した。反応後、残存したＲ体テトラヒドロフラン－２－カルボン酸メチルの光学純度、および反応開始前のラセミ体テトラヒドロフラン－２－カルボン酸メチルの量を１００％としたときの収率を表６に示す。

【００９０】

【表６】

	テトラヒドロフラン-2-カルボン酸メチル	
	光学純度(%ee)	収率(%)
DH5α(pKK-EnHCH1) (2hr)（基質 1%)	98.1(R)	39.6
DH5α(pKK-223-3) (2hr)（基質 1%)	0	95.0
DS-S-75 (24hr)（基質 1%)	95.7(R)	54.4
DS-S-75 (48hr)（基質 1%)	99.9(R)	46.8

【００９１】
ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）により、Ｒ体４－クロロ－３－ヒドロキシブタン酸メチル、Ｓ体３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトン、Ｓ体３－ヒドロキシブタン酸エチル、Ｒ体３－ヒドロキシブタン酸、Ｒ体２－ヒドロキシブタン酸エチル、Ｓ体２－ヒドロキシブタン酸、Ｒ体テトラヒドロフラン－２－カルボン酸メチルを生産することができた。しかも、遺伝子供与体（エンテロバクター属ＤＳ－Ｓ－７５株）と同等かそれ以上の立体識別性を所持し、反応速度は圧倒的に速かった。すなわち、ＥｎＨＣＨをコードする遺伝子を導入したことにより、高い立体選択的加水分解活性能を所持した組換え大腸菌を得ることができた。

【００９２】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>　DAISO Co. Ltd.

<120>　hydroxy carbonic ester hydrolase

<130>　KP-10544

<160>　12

<170>　PatentIn version 3.1

<210>　1
<211>　1990
<212>　DNA
<213>　Enterobacter sp.

<220>

<221> CDS

<222> (742)..(1827)

<223>

<400> 1

aagtggcctt ggcagagagg ttgcgttatt gatggcttcc gaaggggcat cggtcggtat 60

tgctgacctc agtctggcct cagccgaaga ggtggtccgg gaaatacaac tggctggcgg 120

tgaagcgatt gccgttggca tggatgtctc ggacgagcag cagactcagg cgggaaccga 180

cgcgctggtg aatcgttatg gcagtcttga tattctggta tctaatgccg ggatccagat 240

tgtcagtccc ctggatgaat acccgtttgc tgactggcgg aagatgatgg ctgttcatct 300

tgacggggca tttctgacca cccgggcagc actgaaacat atgtacaaaa acccgcaagg 360

ggggacggtc atttatattg gctctgtgca ttcccatgaa gcctcccggc tgaaggcggc 420

gtatgtgacc gccaaacatg ggctgatggg gctggctaag gtggtcgcga aggagggggc 480

tgttcatcac gttcgctcgc atgtagtttg cccgggcttt gttgatacgc cgctggttaa 540

aaagcagatc cctgagcagg cccgtgagct gggtatcagc gaagaggatg tcgtcaaaaa 600

tattatgctg gcggaaaccg ttgacgggca gtttacatcg gaggcggata ttgccgaaac 660

agtacgtttt ctggtgacat ttccttccat ggcgctcacc ggacagtcaa ttacggtcag 720

```
ccacggatgg ggaatgcgct g atg aga aaa acc atg caa cgc agt ttg ctc      771
                        Met Arg Lys Thr Met Gln Arg Ser Leu Leu
                        1               5                   10

tca gcc ctg gtg ctg gtg gct tcc tgt tgt cat ggg gcc tgg gca gta      819
Ser Ala Leu Val Leu Val Ala Ser Cys Cys His Gly Ala Trp Ala Val
                15                  20                  25

tct gct cag gta acc cgc gat acc ctc ggc aca atg gag aaa cag tat      867
Ser Ala Gln Val Thr Arg Asp Thr Leu Gly Thr Met Glu Lys Gln Tyr
            30                  35                  40

caa cag atg tgg gag aaa gaa aat ggc ccg ctg acg ttg tcg cct ccg      915
Gln Gln Met Trp Glu Lys Glu Asn Gly Pro Leu Thr Leu Ser Pro Pro
        45                  50                  55

gcc ccc ctg gcg acg ctg tta tca tcg cta ccc aaa aac agc aat aac      963
Ala Pro Leu Ala Thr Leu Leu Ser Ser Leu Pro Lys Asn Ser Asn Asn
    60                  65                  70

ccc gag tat aat acg ctc gac agc cgt gat gcg ttg act gcg ctg acc     1011
Pro Glu Tyr Asn Thr Leu Asp Ser Arg Asp Ala Leu Thr Ala Leu Thr
75                  80                  85                  90

caa aag tac gtg acg gat aaa caa tcc ata gcc cga att atc aat gtg     1059
Gln Lys Tyr Val Thr Asp Lys Gln Ser Ile Ala Arg Ile Ile Asn Val
                95                  100                 105

gat gtc gcg gtg ccg gga cga aaa att ccg gta cgg atc tac aac ccg     1107
```

```
Asp Val Ala Val Pro Gly Arg Lys Ile Pro Val Arg Ile Tyr Asn Pro
            110                 115                 120

cat ccg gat ata gca acc ggg gtg att ttc ttc att cat ggt ggg ggg      1155
His Pro Asp Ile Ala Thr Gly Val Ile Phe Phe Ile His Gly Gly Gly
        125                 130                 135

cat ctg agt ggt tcg gtg gat gtt tac gac ccg ata gcc cgt cat ctg      1203
His Leu Ser Gly Ser Val Asp Val Tyr Asp Pro Ile Ala Arg His Leu
    140                 145                 150

gcg gct gca acc ggt aat acc gtc gtg gca gtg gac tat cgg cgg gcg      1251
Ala Ala Ala Thr Gly Asn Thr Val Val Ala Val Asp Tyr Arg Arg Ala
155                 160                 165                 170

ccg gag tcc ccc tat ccg gag gga ctt cac gat gcg cgt gat gtc ctg      1299
Pro Glu Ser Pro Tyr Pro Glu Gly Leu His Asp Ala Arg Asp Val Leu
                175                 180                 185

atg cag gtt tac gct gta ctg gat cag aac cat gtt ccc tgg aaa ccg      1347
Met Gln Val Tyr Ala Val Leu Asp Gln Asn His Val Pro Trp Lys Pro
            190                 195                 200

caa ctg act ctg gcc gga gac agc gga ggt ggg gca ttc agc gcc acg      1395
Gln Leu Thr Leu Ala Gly Asp Ser Gly Gly Gly Ala Phe Ser Ala Thr
        205                 210                 215

ctt gcc ggc gat tta cag act gaa cac ccg ggc ttt atc tcc cgc ctg      1443
Leu Ala Gly Asp Leu Gln Thr Glu His Pro Gly Phe Ile Ser Arg Leu
```

220 225 230

gag ctg att tat ccc agc ctg gat tac acg ttg tcc tgg cct tcc gct 1491
Glu Leu Ile Tyr Pro Ser Leu Asp Tyr Thr Leu Ser Trp Pro Ser Ala
235 240 245 250

gat gaa aat ggg cag ggt aaa ttg ctt gat aaa agc aaa gtg gcc tgg 1539
Asp Glu Asn Gly Gln Gly Lys Leu Leu Asp Lys Ser Lys Val Ala Trp
255 260 265

tac ttc agt cag tat ttt cag cat ggt gaa gac aga gcg tcg ctt tca 1587
Tyr Phe Ser Gln Tyr Phe Gln His Gly Glu Asp Arg Ala Ser Leu Ser
270 275 280

ccg ttg tac aga tca gtc acg cgg gcg ttt ccg ccc aca ctt att ttt 1635
Pro Leu Tyr Arg Ser Val Thr Arg Ala Phe Pro Pro Thr Leu Ile Phe
285 290 295

agt ggc ggt ctg gat cca tta cgt gat gag gat ttt gct ttt gtt gcc 1683
Ser Gly Gly Leu Asp Pro Leu Arg Asp Glu Asp Phe Ala Phe Val Ala
300 305 310

cga ctg aaa agc gcc gga gtg ccg gtc agg cat atc cac ttc ccg ggg 1731
Arg Leu Lys Ser Ala Gly Val Pro Val Arg His Ile His Phe Pro Gly
315 320 325 330

atg gta cat gca ttt ctg atg ctt gaa aat ctg gtg ccg cag caa act 1779
Met Val His Ala Phe Leu Met Leu Glu Asn Leu Val Pro Gln Gln Thr
335 340 345

gca cag gtt tat cag gct acc gct gat ttc att gcc aca cca gcc cat 1827
Ala Gln Val Tyr Gln Ala Thr Ala Asp Phe Ile Ala Thr Pro Ala His
350 355 360

taggtctgag gggcagtttc cgcaactgcc cctgtgattt cgttaacgaa ttacctgttc 1887

gtggcgtgat ttgttttcat tgggacagaa acgcagcctt ttaagcctgc tgtctggtcg 1947

ctgccagcac aatttcgcgg atacagacgt tttgaggctg cag 1990

<210> 2
<211> 362
<212> PRT
<213> Enterobacter sp.

<400> 2

Met Arg Lys Thr Met Gln Arg Ser Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Val
1 5 10 15

Ala Ser Cys Cys His Gly Ala Trp Ala Val Ser Ala Gln Val Thr Arg
20 25 30

Asp Thr Leu Gly Thr Met Glu Lys Gln Tyr Gln Gln Met Trp Glu Lys
35 40 45

Glu Asn Gly Pro Leu Thr Leu Ser Pro Pro Ala Pro Leu Ala Thr Leu

50 55 60

Leu Ser Ser Leu Pro Lys Asn Ser Asn Asn Pro Glu Tyr Asn Thr Leu
65 70 75 80

Asp Ser Arg Asp Ala Leu Thr Ala Leu Thr Gln Lys Tyr Val Thr Asp
85 90 95

Lys Gln Ser Ile Ala Arg Ile Ile Asn Val Asp Val Ala Val Pro Gly
100 105 110

Arg Lys Ile Pro Val Arg Ile Tyr Asn Pro His Pro Asp Ile Ala Thr
115 120 125

Gly Val Ile Phe Phe Ile His Gly Gly Gly His Leu Ser Gly Ser Val
130 135 140

Asp Val Tyr Asp Pro Ile Ala Arg His Leu Ala Ala Ala Thr Gly Asn
145 150 155 160

Thr Val Val Ala Val Asp Tyr Arg Arg Ala Pro Glu Ser Pro Tyr Pro
165 170 175

Glu Gly Leu His Asp Ala Arg Asp Val Leu Met Gln Val Tyr Ala Val
180 185 190

Leu Asp Gln Asn His Val Pro Trp Lys Pro Gln Leu Thr Leu Ala Gly
195 200 205

Asp Ser Gly Gly Gly Ala Phe Ser Ala Thr Leu Ala Gly Asp Leu Gln
210 215 220

Thr Glu His Pro Gly Phe Ile Ser Arg Leu Glu Leu Ile Tyr Pro Ser
225 230 235 240

Leu Asp Tyr Thr Leu Ser Trp Pro Ser Ala Asp Glu Asn Gly Gln Gly
245 250 255

Lys Leu Leu Asp Lys Ser Lys Val Ala Trp Tyr Phe Ser Gln Tyr Phe
260 265 270

Gln His Gly Glu Asp Arg Ala Ser Leu Ser Pro Leu Tyr Arg Ser Val
275 280 285

Thr Arg Ala Phe Pro Pro Thr Leu Ile Phe Ser Gly Gly Leu Asp Pro
290 295 300

Leu Arg Asp Glu Asp Phe Ala Phe Val Ala Arg Leu Lys Ser Ala Gly
305 310 315 320

Val Pro Val Arg His Ile His Phe Pro Gly Met Val His Ala Phe Leu
325 330 335

Met Leu Glu Asn Leu Val Pro Gln Gln Thr Ala Gln Val Tyr Gln Ala
340 345 350

Thr Ala Asp Phe Ile Ala Thr Pro Ala His
355 360

<210>　3

<211>　27

<212>　PRT

<213>　Enterobacter sp.

<400>　3

Val Ser Ala Gln Val Thr Arg Asp Thr Leu Gly Thr Met Glu Lys Gln
1　　　　　　　5　　　　　　　　　　10　　　　　　　　　　15

Tyr Gln Gln Met Trp Glu Lys Glu Asn Gly Pro
　　　　　　20　　　　　　　　　　25

<210>　4

<211>　9

<212>　PRT

<213>　Enterobacter sp.

<400>　4

Arg Arg Ala Pro Glu Ser Pro Tyr Pro
1　　　　　　　5

<210>　5

<211>　21

<212>　DNA

<213>　Artificial

<220>
<223> Designed primer sequence based on partial peptide sequence of EnH CH

<400> 5
aarcartayc arcaratgtg g 21

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Designed primer sequence based on partial peptide sequence of EnH CH

<400> 6

Arg Thr Ala Asn Gly Gly Asn Ser Trp Tyr Thr Cys Asn Gly Gly Asn
1 5 10 15

Gly Cys

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Enterobacter sp.

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 7

Met Arg Lys Thr Met Gln Arg Ser Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Val
1   5   10   15

Ala Ser Cys Cys His Gly Ala Trp Ala
            20   25

<210> 8

<211> 75

<212> DNA

<213> Enterobacter sp.

<400> 8

atgagaaaaa ccatgcaacg cagtttgctc tcagccctgg tgctggtggc ttcctgttgt   60

catggggcct gggca   75

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed primer sequence for construction of pKK-EnHCH1

<400> 9
ccgaattcat ggggaatgcg ctgatgag 28

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed primer sequence for construction of pKK-EnHCH2

<400> 10
ccgaattcat gagaaaaacc atgcaacg 28

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed primer sequence for construction of pKK-EnHCH3

<400> 11
ccgaattcat gcaacgcagt ttgctctc 28

<210> 12
<211> 29

<212>　DNA

<213>　Artificial

<220>

<223>　Designed primer sequence for construction of pKK-EnHCH4

<400>　12

ccgaattcat gtctgctcag gtaacccgc　　29

【図面の簡単な説明】

【図１】

コロニーハイブリダイゼーションにより得られたpBluescriptIIＫＳにクローニングされたＥｎＨＣＨ遺伝子（ｐＢｌ－ＥｎＨＣＨ１）の摸式図。ＯＲＦを挟むＢａｍＨ１－Ｐｓｔ１部位間で塩基配列の決定を行なった。ＯＲＦは１０８６bp、３６２アミノ酸をコードしている。このうち、Ｎ末端側２５アミノ酸はシグナルペプチドである。

【図２】

ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１～４の構築におけるＰＣＲプライマーの解説である。開始コドンとして推定される３種類のＡＴＧ配列について、ＥｃｏＲＩをすぐ上流に付加したＰＣＲプライマーを設計し、ｐＵＣ１１８由来のＭ１３プライマーと組み合わせてＰＣＲを行なった。また、精製酵素のＮ末端であるバリンから翻訳させるために、バリンをメチオニンに置換したＰＣＲプライマーを設計し、同様にＰＣＲを行なった。

【図３】

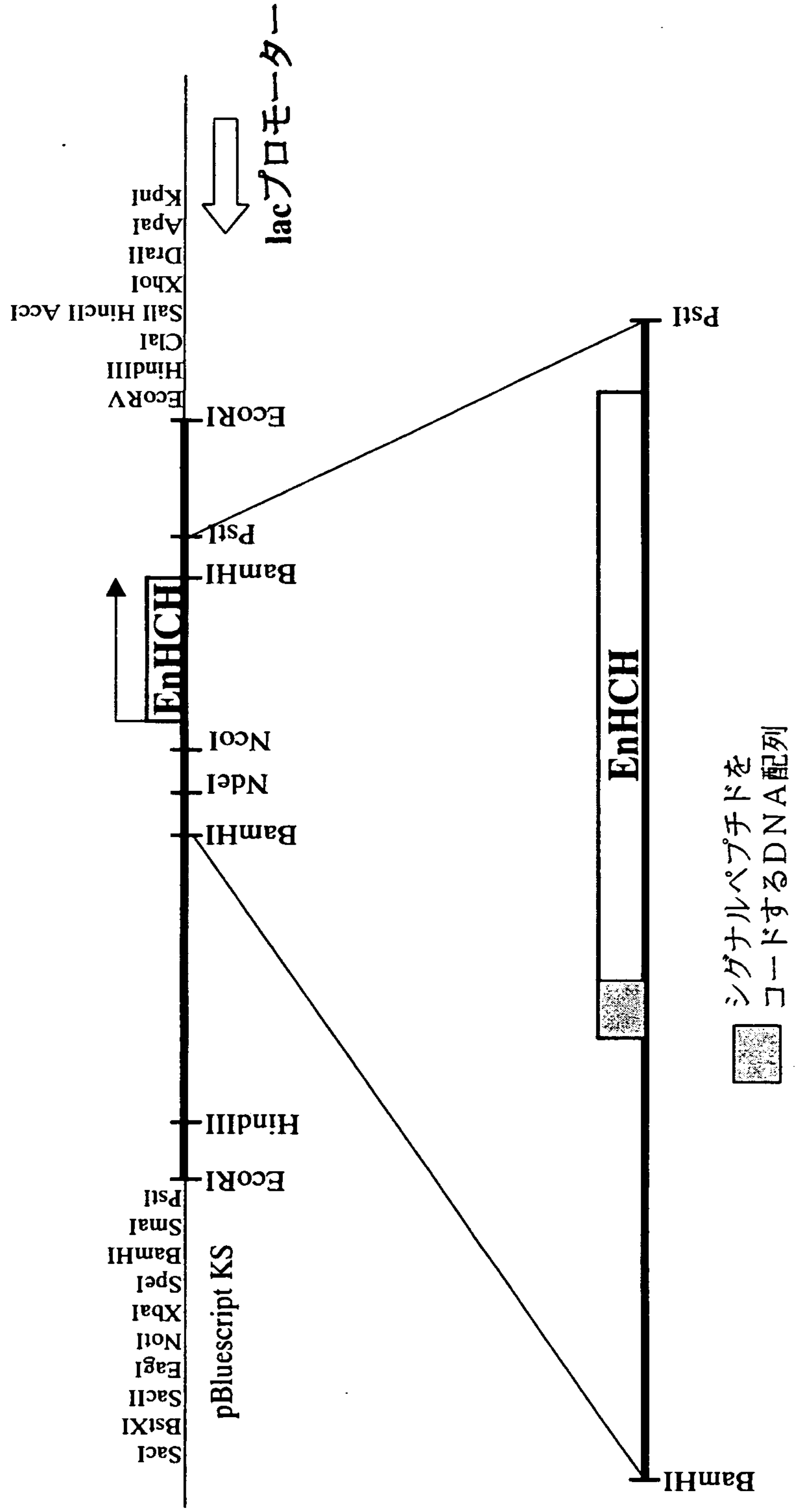
図２で得られたＰＣＲ産物のプラスミドｐＫＫ２２３－３へのサブクローニングを示している。まず、ｐＵＣ１１８に平滑末端でサブクローニングし、上流側約４００bpの塩基配列を決定した。ＰＣＲ伸長エラーがないかを確認後、Ｔｔｈ１１１Ｉ－ＰｓｔＩ間の配列をｐＢｌ－ＥｎＨＣＨのものと置換し、ＥｃｏＲＩ－ＰｓｔＩでｐＫＫ２２３－３のtacプロモーター下流に連結した。

【図４】

組換えタンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ写真である。左のレーンから遺伝子供与体（ＤＳ－Ｓ－７５株）由来精製ＥｎＨＣＨ、ＪＭ１０９（ｐＫＫ２２３－３）の抽出液、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ１）の抽出液、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ２）の抽出液、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ３）の抽出液、ＪＭ１０９（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ４）の抽出液、分子量マーカーである。遺伝子供与体の精製ＥｎＨＣＨと同じ位置に組換えＥｎＨＣＨのバンドが確認できた。

【書類名】　　　　図面

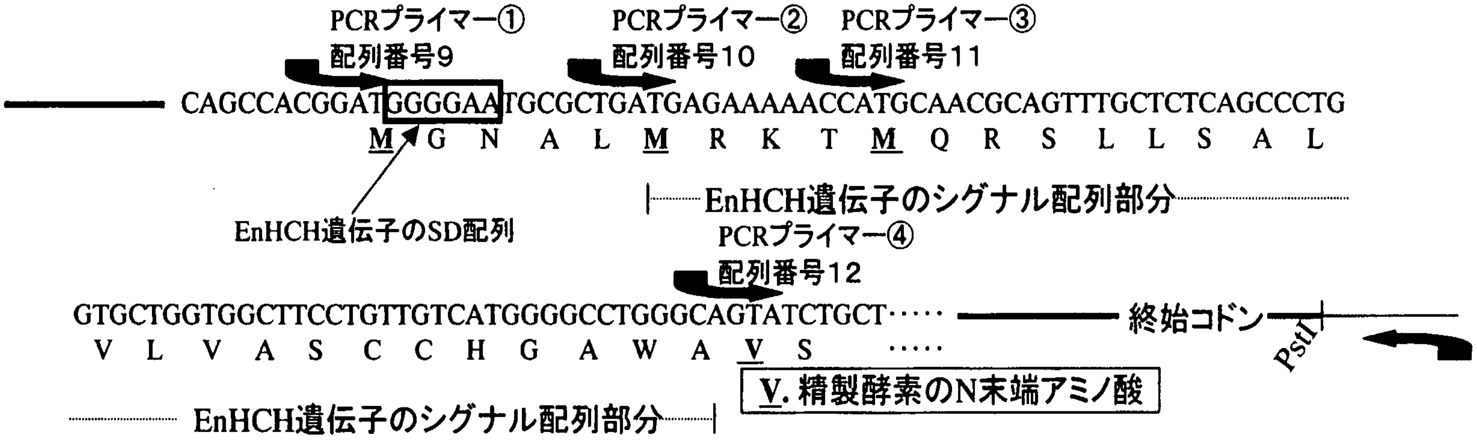
【図１】



pBI－EnHCHの模式図

【図２】

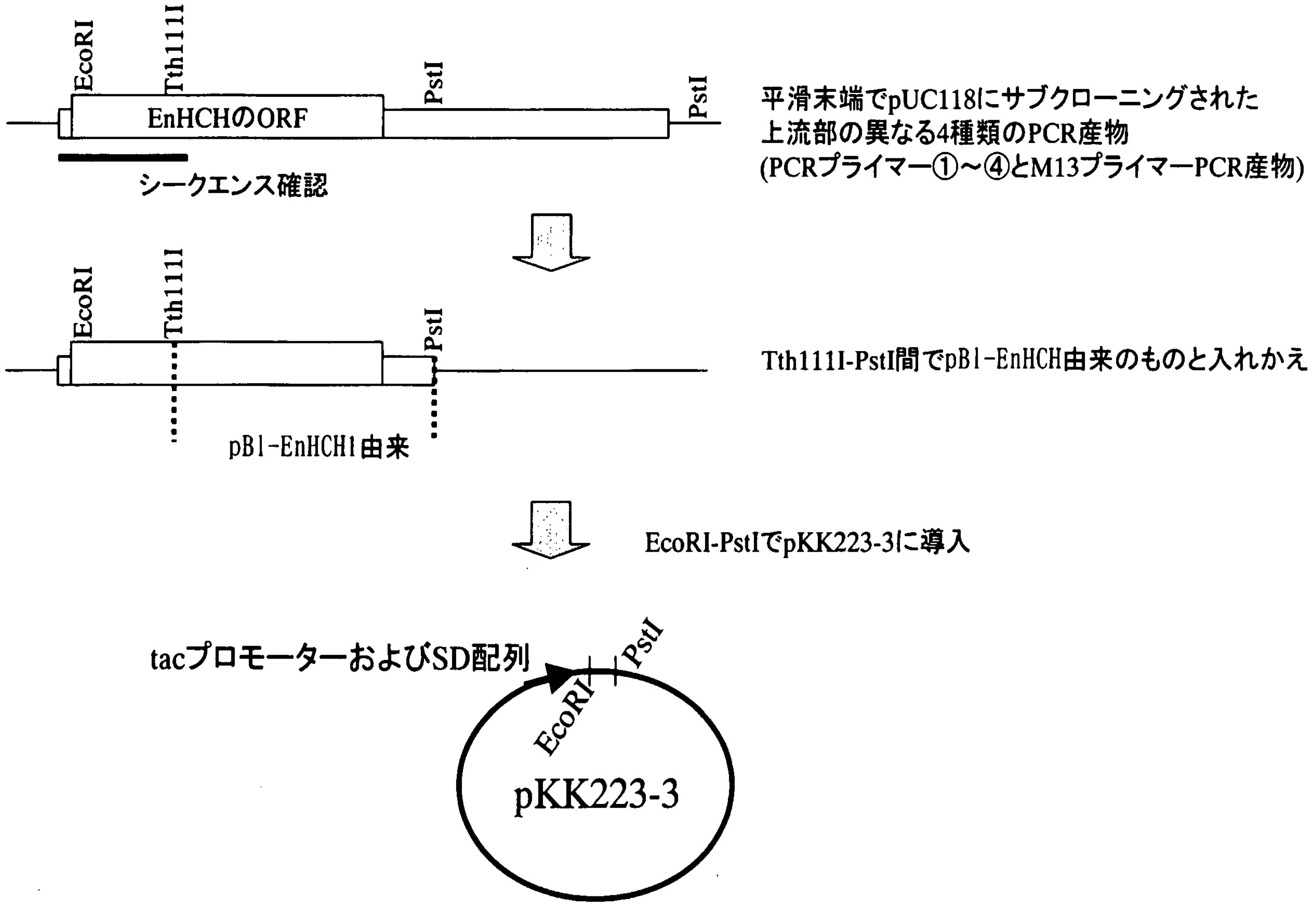
pKK-EnHCH1-4の構築①


PCRプライマー①
配列番号9
PCRプライマー②
配列番号10
PCRプライマー③
配列番号11
CAGCCACGGATGGGGAATGCGCTGATGAGAAAAACCATGCAACGCAGTTTGCTCTCAGCCCTG
M G N A L M R K T M Q R S L L S A L
EnHCH遺伝子のSD配列
EnHCH遺伝子のシグナル配列部分
PCRプライマー④
配列番号12
GTGCTGGTGGCTTCCTGTTGTCATGGGGCCTGGGCAGTATCTGCT・・・・・
V L V A S C C H G A W A V S ・・・・・
終始コドン
PstI
V. 精製酵素のN末端アミノ酸
EnHCH遺伝子のシグナル配列部分

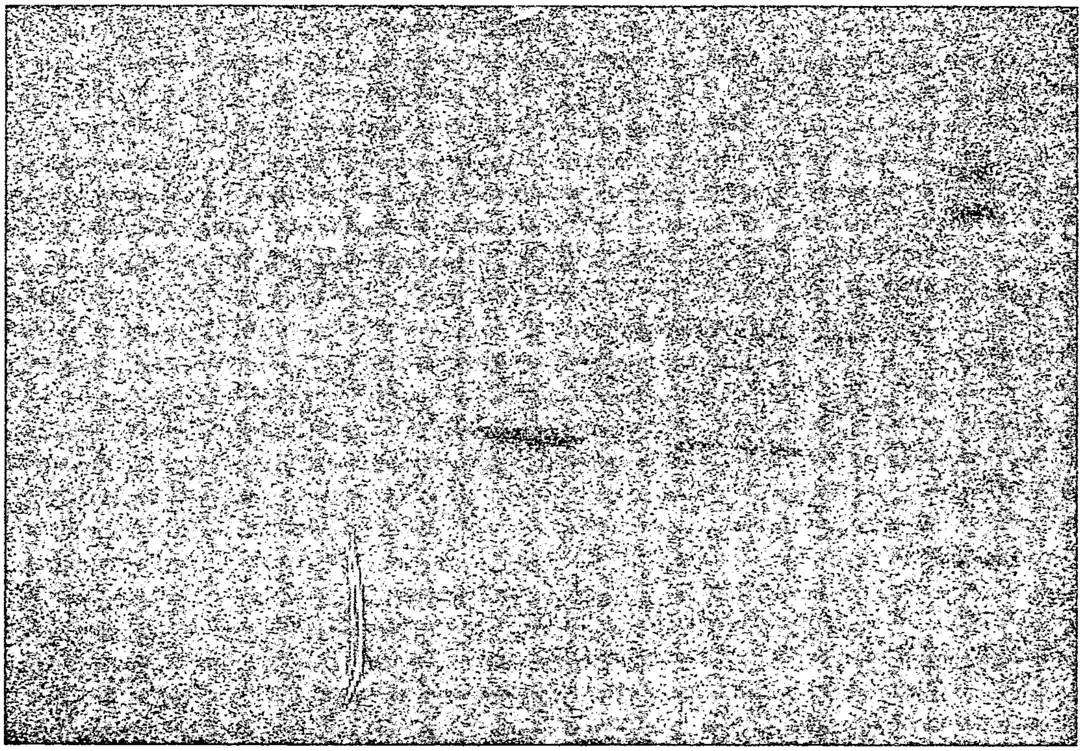
①～④各プライマーにEcoRI部位を付与し、
M13プライマーを組み合わせてPCRを行なった。

【図３】

pKK-EnHCH1-4の構築②


EcoRI
Tth111I
PstI
PstI
EnHCHのORF
シークエンス確認
平滑末端でpUC118にサブクローニングされた
上流部の異なる4種類のPCR産物
(PCRプライマー①～④とM13プライマーPCR産物)
EcoRI
Tth111I
PstI
pBI-EnHCH1由来
Tth111I-PstI間でpBI-EnHCH由来のものと入れかえ
EcoRI-PstIでpKK223-3に導入
tacプロモーターおよびSD配列
EcoRI
PstI
pKK223-3

【図４】



【書類名】　要約書

【要約】

【課題】　光学活性カルボン酸、その対掌体エステル、およびラクトンの合成に有用な不斉加水分解酵素遺伝子を提供する。

【解決手段】　エンテロバクター属に属する細菌であるEnterobacter sp. ＤＳ-Ｓ-７５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５４９４）由来のヒドロキシカルボン酸エステル不斉水解酵素（ＥｎＨＣＨ）、配列番号１の塩基配列で表されるＥｎＨＣＨ遺伝子、配列番号２のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子、及び受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ１９０１４として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている大腸菌ＤＨ５α（ｐＫＫ－ＥｎＨＣＨ）。

【選択図】　なし

特願２００２－２９３５１２

出願人履歴情報

識別番号　　　　［０００１０８９９３］

１．変更年月日　　１９９０年　８月２１日
　　［変更理由］　新規登録
　　　　住　所　　大阪府大阪市西区江戸堀１丁目１０番８号
　　　　氏　名　　ダイソー株式会社